Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Adenylatzyklase in der menschlichen Magenschleimhaut: Untersuchungen zur Methodik und Enzymaktivierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Maria Rack
aus Wangen im Allgäu
1979

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Adenylatzyklase in der menschlichen Magenschleimhaut: Untersuchungen zur Methodik und Enzymaktivierung

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Maria Rack
aus Wangen im Allgäu
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. Ruoff
(Prof. Dr. med. M. Siess)
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Malchow

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Ruoff für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine freundliche Unterstützung.
Ich danke Herrn Beer für seine hilfreiche wissenschaftliche Anleitung und Frau Frisch für die sorgfältige Fertigstellung der Abbildungen.

Gewidmet

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINFÜHRUNG 1

2. METHODIK 7
2.1. Untersuchungsmaterial 7
2.2. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials .. 7
2.3. Adenylatzyklasebestimmung 7
2.4. cAMP-Bestimmung mit dem Proteinbindungstest von Gilman 9
2.5. Verwendete Substanzen 10

3. ERGEBNISSE 11
3.1. Ermittlung der Bedingungen zur Messung der Adenylatzyklase 11
3.1.1. Inkubationsdauer 11
3.1.2. Proteinkonzentration 11
3.1.3. Einfluß von EDTA und Dithiothreitol 11
3.1.4. Verschiedene Homogenisationsmedien 15
3.1.5. Substratkonzentration 15
3.1.6. Magnesiumkonzentration 18
3.1.7. Theophyllin 18
3.1.8. Zusammenfassung der optimalen Bedingungen zur Messung der Adenylatzyklase-aktivität in minimalen Gewebeproben 21
3.2. Aktivierung und Hemmung der Adenylatzyklase durch verschiedene Substanzen .. 21
3.2.1. Cimetidin, Mepyramin, Propranolol 21
3.2.2. Histaminwirkung und H_1- oder H_2-Rezeptorenblockade 23
3.2.3. Histamin und Adrenalin 23

Seite

3.3. Einfluß von Histamin, Adrenalin, Pentagastrin, Carbachol und NaF auf die Adenylatzyklaseaktivität in Fundusbiopsieproben 27

4. DISKUSSION 29
4.1. Adenylatzyklasebestimmung 29
4.2. Aktivierung und Hemmung der Adenylatzyklase 33

5. ZUSAMMENFASSUNG 39

6. LITERATURVERZEICHNIS 41

1. EINFÜHRUNG

Die HCl-Sekretion der Magenschleimhaut unterliegt hormoneller, nervöser und lokal-chemischer Steuerung. Drei körpereigene Substanzen stimulieren die Säuresekretion: das biogene Amin Histamin, das in der Antrumschleimhaut gebildete Peptidhormon Gastrin und der vagale Transmitter Acetylcholin. Obwohl die säurestimulierende Potenz dieser drei Substanzen schon lange bekannt ist, sind die Kenntnisse über den Mechanismus der Transformation des extrazellulären Signals in die physiologische Antwort, nämlich die Sekretion von H-Ionen durch die Parietalzellen, und die sich dabei abspielenden intrazellulären molekularbiologischen Vorgänge sehr gering.

Ein neues Kapitel in der Erforschung der Hormonwirkung, d.h. des Übertragungsmodus hormoneller Signale vom Rezeptor an der Plasmamembran ins Zellinnere, begann 1957, als Rall et al. beim Studium der hyperglykämischen Wirkung von Adrenalin und Glukagon eine hitzestabile Verbindung nachwiesen, die über eine Aktivierung der Leberphosphorylase beim Prozeß der Glykogenolyse erforderlich ist. 1958 wurde dann dieser Faktor von Rall und Sutherland als zyklisches 3′,5′-Adenosinmonophosphat (cAMP) identifiziert, und damit war nachgewiesen, daß die glykogenolytische Wirkung von Adrenalin und Glukagon (first messenger oder erster Bote) über einen intrazellulären Mediator (second messenger oder zweiter Bote) vermittelt wird.

Dieses second-messenger-Prinzip soll im folgenden am Beispiel der Glykogenolyse im Skelettmuskel kurz beschrie-

ben werden. Dort ist die hormonelle Kontrolle via cAMP am gründlichsten untersucht und die intrazelluläre Reaktionsfolge, über die das unter Hormoneinfluß gebildete cAMP wirkt, bereits ermittelt worden.
Das Hormon reagiert mit einer spezifischen Rezeptorstelle in der äußeren Zellmembran, und dies führt zur allosterischen Aktivierung eines Enzyms, der membrangebundenen Adenylatzyklase (AC). An der sogenannten Katalysestelle an der inneren Oberfläche der Zellmembran läuft die cAMP-Synthese aus Adenosintriphosphat (ATP) ab. Nach der Theorie von Rodbell et al. (1971) gibt es in der Nähe der Hormonbindung gelegene Regulationsstellen, die die Affinität des Membranrezeptors für das entsprechende Hormon und die Reaktionsgeschwindigkeit des katalytischen Systems modifizieren können, sowie noch einen besonderen Koppelungsmechanismus als Vermittler zwischen Hormonbindung und AC-Aktivierung. Das gebildete cAMP aktiviert danach allosterisch eine Proteinkinase, die wiederum die inaktive Phosphorylasekinase b durch Phosphorylierung des Enzyms mittels einer ATPase in die aktive Form überführt. Letztere (ein sog. Kontrollenzym) aktiviert die Muskelphosphorylase b zur aktiven Form a. Parallel zu diesem Prozeß wird - ebenfalls über die cAMP-abhängige Proteinkinase - die aktive Glykogensynthetase I in die inaktive D-Form überführt (Soderling et al., 1970).

Die allgemeine Bedeutung dieses Wirkungsmechanismus liegt einmal in einem Verstärkereffekt, der durch die Bildung des second messenger zustandekommt. Zum anderen darin, daß verschiedene Organsysteme, in Abhängigkeit von den jeweiligen spezifischen Rezeptoren und cAMP-empfindlichen Enzymsystemen, nach dem gleichen Grundprinzip durch Hormone beeinflußt werden können; denn

seit der Entdeckung des cAMP bei der Adrenalin- und Glukagonstimulierten Glykogenolyse wurde die Bedeutung dieses Prinzips auch für den Wirkungsmechanismus anderer Hormone erkannt. Das zyklische Nukleotid wird inzwischen mit solch verschiedenen Prozessen wie z.B. Hormonsynthese und -freisetzung, Muskelzellkontraktion, Neurotransmission und natürlich auch exogenen Sekretionsprozessen in Verbindung gebracht, was auf seine ubiquitäre Bedeutung hinweist.

Wie schon eingangs erwähnt, unterliegt die Magensäuresekretion teilweise auch hormoneller Kontrolle. Deshalb stellte sich natürlich die Frage, ob dieses für verschiedene Hormone gültige Prinzip einer intrazellulären Wirkungsvermittlung auch auf den HCl-Sekretionsprozeß der Magenschleimhaut übertragbar ist. Dies erschien von besonderem Interesse bei einem Mechanismus, der z.B. pro Tag 10 mal mehr Flüssigkeit produziert als die ihn sezernierende Schleimhaut wiegt, und dessen H-Ionenkonzentration eine Million mal höher ist als die der extrazellulären Flüssigkeit. Die Verifizierung des second-messenger-Prinzips bei diesen Transportprozessen gegen einen so hohen Konzentrationsgradienten würde neue Anhaltspunkte für die bislang unbekannten biochemischen Reaktionen bei der HCl-Sekretion liefern.

1965 postulierten Alonso und Harris erstmals die second-messenger-Hypothese für die HCl-Sekretion. Bei in vitro-Untersuchungen an der isolierten Froschmagenmukosa wiesen sie eine Stimulierbarkeit der Säuresekretion durch exogenes cAMP und auch durch Methylxanthine nach. Diese Stoffgruppe hemmt die Phosphodiesterase (PDE), ein Enzymsystem, welches den cAMP-Abbau katalysiert (Sutherland and Rall, 1958).

Schon 1962 hatten jedoch Orloff und Handler gezeigt, daß in der Krötenblase der Natriumtransport durch cAMP stimuliert werden kann. Sie hatten damit einen ersten Hinweis erbracht, daß der Ionentransport im Zusammenhang mit dem cAMP-System stehen könnte.

Seit 1970 stehen mit dem Proteinbindungstest von Gilman und dem Radioimmunoassay von Steiner et al. (1972 a und b) einfacher zu handhabende und empfindlichere Methoden für die cAMP-Messung zur Verfügung. Dadurch wurden umfangreichere Untersuchungen an der Magenschleimhaut verschiedener Tierarten möglich. Viele Befunde für und wider die Harris-Hypothese wurden inzwischen hauptsächlich aus Untersuchungen an Amphibien und Nagetieren veröffentlicht (Übersichten bei Kimberg, 1974; Jacobson und Thompson, 1976; Ruoff und Sewing, 1977).

In der Amphibienschleimhaut ließ sich ziemlich übereinstimmend eine Stimulierbarkeit der H-Ionen-Sekretion durch Methylxanthine und exogen zugeführtes cAMP sowie auch eine Aktivierbarkeit der AC durch Acetylcholin, Histamin und Pentagastrin in vitro nachweisen.
Bei Nagetieren erhöhten die Sekretagoga Histamin, Pentagastrin und Carbachol die cAMP-Konzentration der Magenschleimhaut nach in vivo-Applikation. In vitro konnte dagegen bislang nur mit Histamin eine Aktivierbarkeit der AC demonstriert werden. Dieser Effekt des Histamin wird mit großer Wahrscheinlichkeit wie die säurestimulierende Wirkung über H_2-Rezeptoren vermittelt.
Von höheren Säugern (Katze, Hund) und auch vom Menschen liegen bis jetzt wenige und in ihren Ergebnissen sehr widersprüchliche Untersuchungen vor.

So spricht zum jetzigen Zeitpunkt zwar vieles dafür, daß

die Histaminwirkung auf die Säuresekretion über das cAMP-System vermittelt wird. Eine endgültige Klärung der Rolle und Aufgabe dieses Mediatorsystems steht allerdings noch aus, umsomehr, als inzwischen auch eine aktivierende Wirkung der Prostaglandine und Katecholamine auf die AC der Magenschleimhaut verschiedener Spezies nachgewiesen wurde, d.h. von Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf die Säuresekretion ausüben.

Damit wird ein wesentliches Problem bei den Untersuchungen über die Rolle des cAMP beim Säuresekretionsprozeß angesprochen: die Zellheterogenität.
Es gibt mindestens vier verschiedene Zelltypen in der Magenschleimhaut von Säugern: a) Parietalzellen für die Wasser- und Elektrolytsekretion und die Bildung von intrinsic factor, b) Hauptzellen, die proteolytische Enzyme sezernieren, c) schleimbildende Zellen und d) enterochromaffine Zellen mit unbekannter Funktion. Die HCl-sezernierenden Parietalzellen machen dabei nur etwa ein Zehntel der gesamten Zellpopulation aus. Eine Zuordnung der Aktivatoren der AC zu den verschiedenen Zelltypen wird wahrscheinlich nur über eine Isolierung der unterschiedlichen Zellpopulationen möglich sein. Ansätze dazu scheinen allmählich konkretere Formen anzunehmen. (Soll, 1978; Sonnenberg et al., 1978).

Einen weiteren Grund für die Widersprüchlichkeit vieler bisheriger Befunde sehen Jacobson und Thompson (1976) in technischen Problemen der cAMP- und AC-Bestimmung. In ihrer kritischen Übersicht bemängeln sie, daß in vielen Untersuchungen veraltete Testmethoden für die Bestimmung von cAMP und der Enzymaktivitäten eingesetzt wurden. In diesen methodischen Problemen sehen sie eine Hauptschwierigkeit, aus den vielen Ergebnissen eine endgültige Aus-

sage zu formulieren.

Von daher war das Ziel der vorliegenden Untersuchung: 1) eine zuverlässige Bestimmungsmethode für die Messung der AC-Aktivität zu entwickeln, die es auch erlauben würde, die Aktivität in minimalen Gewebemengen von 0,5 bis 3,0 mg, d.h. in Biopsieproben des menschlichen Magens, zu bestimmen und 2) mit Hilfe dieser Methode die Stimulierbarkeit der bislang noch nicht untersuchten menschlichen AC aus der Fundusschleimhaut durch verschiedene Substanzen zu untersuchen.

2. METHODIK

2.1. Untersuchungsmaterial

a) Fundusschleimhaut von einem Zweidrittel-Resektionspräparat eines 46-jährigen Patienten mit Ulcus duodeni, der nach Billroth II operiert wurde.
b) Biopsieproben (0.5 - 3 mg) aus dem Magenfundus von 12 ambulanten Patienten, die wegen Beschwerden im oberen Gastrointestinaltrakt nach einer 12-stündigen Fastenperiode endoskopiert wurden.

2.2. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Einige mg der tiefgefrorenen Fundusschleimhaut bzw. die Biopsieprobe wurden gewogen und anschließend in einem Glashomogenisator 1 min lang mit einem bestimmten Volumen des eiskalten Homogenisationsmediums mit der Hand homogenisiert. Folgende Homogenisationsmedien wurden geprüft: a) Tris-Puffer (25×10^{-3} mol/l, pH 7.8), b) Tris-Puffer + Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA, 10^{-4} mol/l), c) Tris-Puffer + Dithiothreitol (DTT, 10^{-4} mol/l). Das rohe Homogenat wurde sofort zur Messung der AC-Aktivität eingesetzt.

2.3. AC-Bestimmung

Als Maß für die Bestimmung der AC-Aktivität (Ruoff und Sewing, 1975) diente das pro Zeiteinheit und mg Gewebe bzw. mg Protein neugebildete cAMP. Neben dem Homogenat als Enzymquelle müssen verschiedene Komponenten zur Messung der AC dem Inkubationsmedium zugesetzt werden: 25×10^{-3} mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7.8; 1 mg/ml Albumin;

15.6×10^{-3} mol/l Kreatinphosphat und 10 U/ml Kreatinkinase als ATP-regenerierendes System. Weiterhin werden verschiedene Testkomponenten benötigt, die im Hinblick auf eine maximale basale und stimulierte AC-Aktivität auf ihre optimale Konzentration hin ausgetestet wurden:
a) EDTA und DTT im Konzentrationsbereich von 10^{-5} - 10^{-2} mol/l,
b) ATP (10^{-5} - 10^{-2} mol/l) als Substrat,
c) $MgCl_2$ (10^{-5} - 10^{-2} mol/l),
d) Theophyllin (3×10^{-4} - 10^{-2} mol/l) als PDE-Inhibitor, um den Abbau des neugebildeten cAMP zu verhindern.
Inkubiert wurde bei 37°C. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 120 µl.
Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenats gestartet. Abgestoppt wurde durch dreiminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad.
Nullwertbestimmung: Nach Zugabe des Homogenats erfolgte ein sofortiger Hitzestop. Die in dieser Probe gemessene cAMP-Menge wurde den Werten der inkubierten Proben abgezogen.
Nach dem Hitzestop wurde der Testansatz mit 50 µl H_2O verdünnt und 30 mg Al_2O_3 zugegeben, um eventuell noch vorhandenes, die cAMP-Messung störendes ATP zu beseitigen. Das Gemisch wurde geschüttelt und 1.5 min bei 2000.g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 x 50 µl zur cAMP-Bestimmung eingesetzt.

Neben den verschiedenen Testkomponenten wurde die Linearität der cAMP-Synthese im Enzymansatz für verschiedene Zeiten (10, 20, 30 min) und verschiedene Gewebe- bzw. Proteinkonzentrationen (50, 100, 200, 400 µg Gewebe entsprechend 8.5 - 64 µg Protein) untersucht.

2.4. cAMP-Bestimmung mit dem Proteinbindungstest (Gilman, 1970)

a) Prinzip:
Das cAMP (unbekannte Menge oder Standard) und eine bestimmte Menge ^{3}H-cAMP konkurrieren um die Bindungsstelle eines spezifischen Proteins (Proteinkinase) mit hoher cAMP-Affinität. Die Menge des entstehenden ^{3}H-cAMP-Proteinkomplexes ist umgekehrt proportional zu der im Ansatz vorhandenen nicht radioaktiven cAMP-Menge. Durch Trennung der freien von der proteingebundenen Radioaktivität ist es mittels Standardwerten möglich, eine unbekannte cAMP-Konzentration zu ermitteln.
b) Bindungsprotein:
Verwendet wurde eine Proteinkinase, die aus Kaninchenmuskel nach der Methode von Miyamoto et al. (1969) im Labor isoliert worden war und zur Verfügung stand. Für die cAMP-Bestimmung wurde das tiefgefrorene Protein aufgetaut und in dem Maße mit Acetatpuffer (5×10^{-2} mol/l, pH 4) und Rinderserumalbumin verdünnt, daß mindestens 30 Prozent des ^{3}H-cAMP (0.5 pmol; spezifische Aktivität 29 Ci/mmol) gebunden wurden (Nullwert).

4 Standardkurven (0, 0.5, 1, 2, 3 und 5 pmol cAMP) wurden bei jeder Meßreihe mitbestimmt. Das Endvolumen des Testansatzes betrug 170 µl.

Anschließend standen die Proben zur Gleichgewichtseinstellung 2 h in Eis. Die Trennung von freiem und gebundenem cAMP erfolgte durch Filtration der Proben über Zelluloseesterfilter. Die Filterplättchen wurden anschließend in einem Szintillationsgefäß in 1 ml Cellosolve (Glycolmonoäthyläther und Glycolmonomethyläther im Verhältnis 1:1) aufgelöst und 10 ml Diotol-Szintillator zugesetzt. Nach einer einstündigen Adaptationsperiode

erfolgte die Messung im Scintillationszähler.

Die Standardkurve hat bei doppeltlogarithmischer Auftragung einen geradlinigen Verlauf. Die Bestimmung der unbekannten cAMP-Proben erfolgte anhand dieser Kurve mittels eines Programms und Rechners (Hewlett-Packard hp 20).

2.5. Verwendete Substanzen

Adenosin-5′-Triphosphat; zyklisches 3′,5′-Adenosinmonophosphat; zyklisches 3′,5′-Adenosin-8-^{3}H-Monophosphat (spezifische Aktivität 29 Ci/mmol, Radiochemical Centre Amersham); Creatinkinase; Creatinphosphat; Serumalbumin (Behringwerke, Marburg); Aluminiumoxid 90 aktiv neutral (Merck, Darmstadt); Theophyllin; L-Adrenalin-Bitartrat (Sanabo, Wien); Propranolol (Dociton^{R}, ICI, Plankstadt); Histamin-Dihydrochlorid (Deutsche Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach); Carbacholchlorid (Doryl^{R}); Pentagastrin (Gastrodiagnost^{R}, E. Merck, Darmstadt); Mepyramin-Maleat (Specia, Paris); Dithiothreitol (EGA-Chemie, Steinheim); Na_2-EDTA (E. Merck AG, Darmstadt), Cimetidin (Smith Kline and French Laboratories Ltd., Welwyn Garden City).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem t-Test für Gruppen.

Pentagastrin wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Wendt, Merck Darmstadt, Cimetidin von Dr. Brimblecombe, Smith Kline and French Laboratories Ltd., zur Verfügung gestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ermittlung der Bedingungen zur Messung der Adenylatzyklase

3.1.1. Inkubationsdauer (Abb. 1)

Pro Ansatz wurden 17 µg Protein (entsprechend 100 µg Feuchtgewicht Gewebe) für 10, 20 und 30 min ohne (Basalaktivität) und mit 10^{-2} mol/l NaF inkubiert und das jeweils gebildete cAMP gemessen. Die Reaktion verlief in beiden Fällen annähernd zeitlinear. Unter Basalbedingungen betrug die cAMP-Bildung im Mittel 2.86 pmol/mg Protein/min, nach NaF-Stimulation 41.7 pmol/mg Protein/min, d.h. NaF steigerte die Syntheserate auf das 14.5-fache.

3.1.2. Proteinkonzentration (Abb. 2)

Es wurden 8.5, 17, 34 und 68 µg Protein (entsprechend 50 bis 400 µg Feuchtgewicht Gewebe) für 20 min mit und ohne 10^{-2} mol/l NaF inkubiert. Es ergab sich eine annähernd lineare Beziehung zwischen eingesetzter Proteinmenge und gebildeter cAMP-Menge. In diesem Versuch betrug die Syntheserate 3.28 pmol cAMP/mg Protein/min unter Basalbedingungen und 29 pmol cAMP/min nach NaF-Stimulation, entsprechend einer 9-fachen Steigerung.

3.1.3. Einfluß von EDTA und Dithiothreitol (Abb. 3)

In Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von EDTA bzw. DTT (10^{-5} - 10^{-2} mol/l) wurden 34 µg Protein 20 min inkubiert. Die unter Einfluß von EDTA bzw. DTT

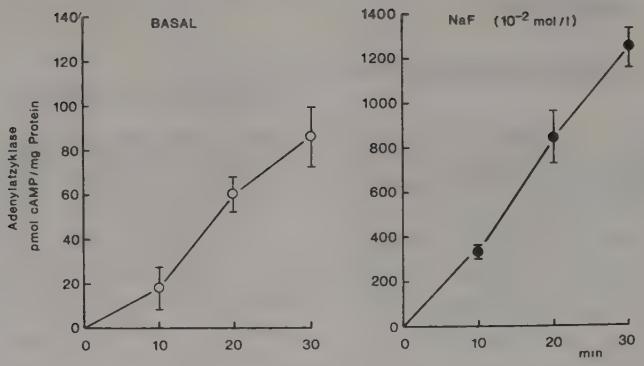

Abb. 1 Adenylatzyklaseaktivität (pmol cAMP/mg Protein) menschlicher Fundusschleimhaut in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer unter Basalbedingungen und unter NaF-Stimulation. Pro Testansatz wurden 100 µg Gewebe, entsprechend 17 µg Protein, eingesetzt. Das Inkubationsmedium enthielt in einem Endvolumen von 120 µl: Tris-HCl (pH 7.8) 2.5×10^{-2} mol/l, $MgCl_2$ und Theophyllin 10^{-2} mol/l, ATP 10^{-3} mol/l, Kreatinphosphat 1.56×10^{-2} mol/l, Kreatinkinase 4 mg/ml und Albumin 1 mg/ml. Inkubiert wurde bei 37°C.
N = 5 - 7, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

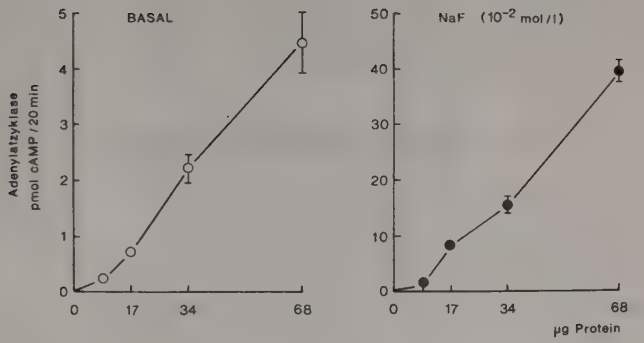

Abb. 2 Adenylatzyklaseaktivität (pmol cAMP/20 min) menschlicher Fundusschleimhaut in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration unter Basalbedingungen und unter NaF-Stimulation. Pro Testansatz wurden 50, 100, 200 und 400 µg Gewebe, entsprechend 8.5 - 64 µg Protein für 20 min inkubiert. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1.
N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

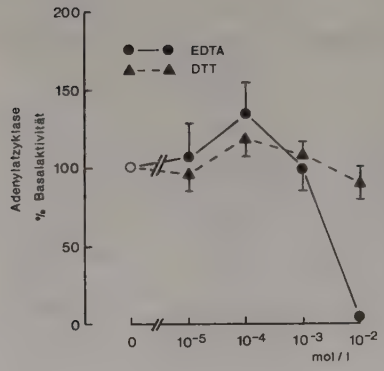

Abb. 3 Einfluß ansteigender Konzentrationen von EDTA und Dithiothreitol (DTT) im Inkubationsmedium auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut. Aktivität ohne EDTA und DTT = 100 %. 34 µg Protein wurden für 20 min inkubiert. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1.
N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

gemessene AC-Aktivität ist in Prozent der Ausgangsaktivität (100 %, ohne Zusatz von EDTA und DTT) angegeben. 10^{-4} mol/l EDTA steigerte die cAMP-Bildung auf 134 %, 10^{-4} mol/l DTT auf 115 % der Ausgangsaktivität ($p > 0.05$). Die bei höheren Konzentrationen dieser Substanzen erfolgte Abnahme der cAMP-Bildung war besonders ausgeprägt unter EDTA. Bei einer Konzentration von 10^{-2} mol/l war praktisch keine Aktivität mehr nachweisbar.

3.1.4. Verschiedene Homogenisationsmedien (Abb. 4)

Gewebeproben derselben Fundusschleimhaut wurden mit 4 verschiedenen Medien homogenisiert (20 mg Gewebe/10 ml): 1. Tris-HCl-Puffer (25×10^{-3} mol/l, pH 7.8), 2. Tris-HCl-Puffer mit EDTA (10^{-4} mol/l), 3. Tris-HCl-Puffer mit DTT (10^{-4} mol/l) und 4. Tris-HCl-Puffer mit EDTA und DTT in den entsprechenden Konzentrationen. Eingesetzt wurden 34 µg Protein. Die Inkubationsdauer betrug 20 min. Die AC-Aktivität nach Homogenisation in der reinen Pufferlösung wurde 100 % gesetzt. 10^{-4} mol/l EDTA im Homogenisationsmedium steigerte die AC-Aktivität der Schleimhaut auf 127 % ($p > 0.05$), 10^{-4} mol/l DTT auf 132 % ($p < 0.05$). Wurde jedoch EDTA zusammen mit DTT in derselben Konzentration verwandt, fand sich eine Steigerung auf 164 % ($p < 0.005$).

3.1.5. Substratkonzentration (Abb. 5)

Das Fundusgewebe wurde in 25 mmol/l Tris-HCl-Puffer zusammen mit 10^{-4} mol/l EDTA und 10^{-4} mol/l DTT homogenisiert und 20 min in einem Medium mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (10^{-5} - 10^{-2} mol/l) inkubiert. 34 µg Protein kamen zum Einsatz. Basal stieg die AC-Aktivität von 34.5 pmol cAMP/mg Protein/20 min (10^{-5} mol/l ATP)

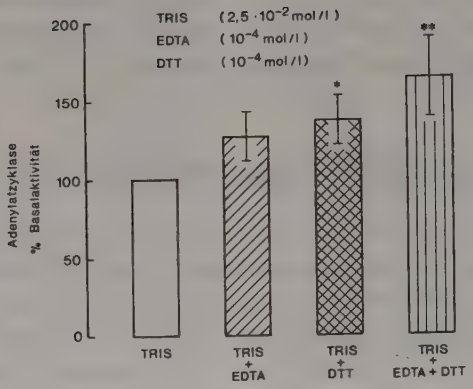

Abb. 4 Einfluß verschiedener Homogenisationsmedien auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut. Aktivität ohne EDTA und DTT = 100 %. 34 µg Protein wurden für 20 min inkubiert. Das Homogenisationsmedium in allen weiteren Versuchen bestand aus 2.5×10^{-2} mol/l Tris-HCl, 10^{-4} mol/l EDTA und 10^{-4} mol/l DTT. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1.
N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.005$ im Vergleich zur Basalaktivität.

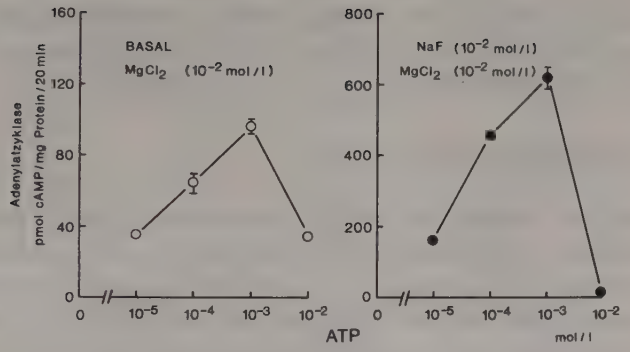

Abb. 5 Einfluß ansteigender Konzentrationen von ATP auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut unter Basalbedingungen und unter NaF-Stimulation. 34 µg Protein wurden für 20 min inkubiert. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1.
N = 7 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

bis auf 96 pmol cAMP/mg Protein/20 min (10^{-3} mol/l ATP), d.h. auf das 2.8-fache des Ausgangswertes, an. Unter NaF-Stimulation stieg sie auf das 3.8-fache von 162 (10^{-5} mol/l ATP) auf 622 pmol cAMP/mg Protein/20 min (10^{-3} mol/l ATP). Höhere Substratkonzentrationen als 10^{-3} mol/l hemmten die AC-Aktivität, besonders unter NaF, wo mit 10^{-2} mol/l ATP nur noch 3 % des Ausgangswertes gemessen wurden.

3.1.6. Magnesium (Abb. 6)

Homogenisationsmedium, Proteinkonzentration und Inkubationsdauer entsprachen in dieser und in der folgenden Untersuchung den unter 3.1.5. angegebenen Bedingungen. Bei optimaler Substratkonzentration von 10^{-3} mol/l ATP, wurden die $MgCl_2$-Konzentrationen im Bereich von 10^{-5} - 10^{-2} mol/l variiert. Sowohl ohne als auch mit NaF zeigte sich erst bei 10^{-3} mol/l $MgCl_2$ eine messbare AC-Aktivität. Basal wurden 149 pmol cAMP/mg Protein/20 min, mit NaF 412 pmol gemessen. In beiden Fällen führte eine Erhöhung der Konzentration auf 10^{-2} mol/l $MgCl_2$ wieder zu einem Rückgang der AC-Aktivität, und zwar auf 65 % des Maximalwerts (unter Basalbedingungen) bzw. auf 85 % (unter NaF-Stimulation).

3.1.7. Theophyllin (Abb. 7)

Bei Konzentrationen von 10^{-3} mol/l ATP und 10^{-3} mol/l $MgCl_2$ wurde die Konzentration des PDE-Hemmers Theophyllin variiert. Unter 3.16×10^{-4} mol/l Theophyllin stieg die gemessene AC-Aktivität von 56 auf 124 pmol cAMP/mg Protein/20 min. Die höchste AC-Aktivität von 192 pmol cAMP/mg Protein/20 min fand sich bei einer Konzentration von 3.16×10^{-3} mol/l Theophyllin. Dies entspricht einer

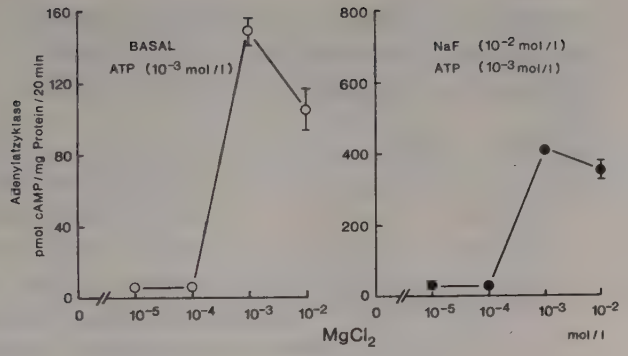

Abb. 6 Einfluß ansteigender Konzentrationen von $MgCl_2$ auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Funduschleimhaut unter Basalbedingungen und unter NaF-Stimulation. 34 µg Protein wurden für 20 min inkubiert. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1.
N = 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

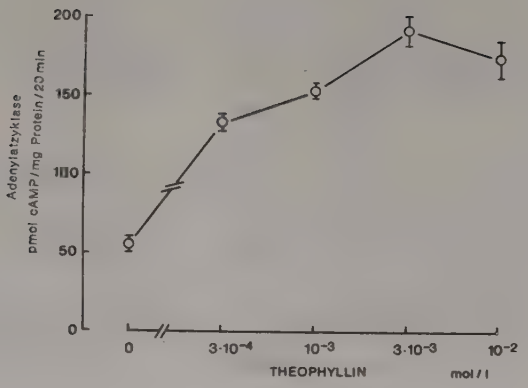

Abb. 7 Einfluß ansteigender Konzentrationen von Theophyllin auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut. 34 µg Protein wurden für 20 min inkubiert. Übrige Bedingungen siehe Legende der Abb. 1. N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Steigerung auf das 3.4-fache, verglichen mit der cAMP-Bildung ohne PDE-Hemmung. Bei noch höheren Konzentrationen (10^{-2} mol/l Theophyllin) sank die Syntheserate auf 174 pmol cAMP/mg Protein/20 min wieder leicht ab.

3.1.8. Zusammenfassung der optimalen Bedingungen zur Messung der AC-Aktivität der menschlichen Fundusschleimhaut in minimalen Gewebeproben

Homogenisationsmedium: 10^{-4} mol/l EDTA + 10^{-4} mol/l DTT in 25 x 10^{-3} mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7.8; Gewebekonzentration 2 mg/100 µl.
Zeitdauer der Inkubation: 20 min (bei 37°C).
Proteinkonzentration: 34 µg Protein pro Ansatz (entsprechend 200 µg Gewebe).
Substratkonzentration: 10^{-3} mol/l ATP.
Theophyllinkonzentration: 3.16 x 10^{-3} mol/l.
Die optimalen Konzentrationen der weiteren Testkomponenten sind in der Methodik angegeben. Die Inkubation der AC unter diesen Bedingungen garantiert eine gute Meßbarkeit der Enzymaktivität mit dem Gilmantest im Bereich von 1 - 20 pmol gebildetem cAMP/Ansatz.

3.2. Aktivierung und Hemmung der AC durch verschiedene Substanzen

3.2.1. Cimetidin, Mepyramin und Propranolol (Abb. 8)

Die Fundusschleimhaut wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} - 10^{-5} mol/l) des Histamin-H_2-Antagonisten Cimetidin, des H_1-Antagonisten Mepyramin und des adrenergen ß-Rezeptorenblockers Propranolol homogenisiert. Die Endkonzentration im Ansatz betrug 1/12 der des Homogenisationsmediums. Die AC-Aktivität ohne Zusatz

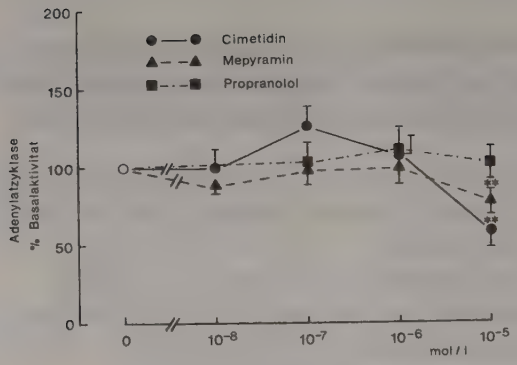

Abb. 8 Einfluß ansteigender Konzentrationen von Cimetidin, Mepyramin und Propranolol auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut in Prozent der Basalaktivität (100 %). In diesen und allen folgenden Untersuchungen wurden die in den vorangehenden Versuchen ermittelten optimalen Konzentrationen für Homogenisation und Inkubation verwandt. Genaue Beschreibung s. Text 3.1.8.

N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, ++ = $p < 0.01$ im Vergleich zum Basalwert.

dieser Substanzen wurde 100 % gesetzt. Der selektive H_2-Rezeptorenblocker Cimetidin führte bei ansteigender Konzentration zunächst zu keiner wesentlichen Änderung der cAMP-Bildung. 10^{-5} mol/l Cimetidin verminderten jedoch die Enzymaktivität um 41 % ($p < 0.01$). Der Kurvenverlauf unter Mepyramin war ähnlich: Bei ansteigender Konzentration zunächst keine Änderung der AC-Aktivität, mit 10^{-5} mol/l jedoch eine Hemmung um 23 % ($p < 0.01$), die aber nicht so ausgeprägt ist wie bei Cimetidin. Im Gegensatz dazu hatte der ß-Rezeptorenblocker Propranolol auch bei höheren Konzentrationen keinen Einfluß auf die basale AC-Aktivität.

3.2.2. Histaminwirkung und H_1- oder H_2-Rezeptorenblockade (Abb. 9)

Linke Seite: 10^{-3} mol/l Histamin steigerte die cAMP-Bildung auf 185 % ($p < 0.0025$), 10^{-6} mol/l Mepyramin führte zu einem geringen Anstieg auf 112 %.
In Gegenwart von 10^{-6} mol/l Mepyramin war keine Abnahme des Histamineffekts (10^{-3} mol/l) festzustellen, im Vergleich zur alleinigen Histaminwirkung zeigte sich sogar eine Zunahme der cAMP-Bildung um 39 % ($p > 0.05$).
Rechte Seite: 10^{-3} mol/l Histamin steigerte die cAMP-Bildung auf 200 % ($p < 0.005$). 10^{-6} mol/l Cimetidin beeinflußte die Basalaktivität nicht, reduzierte jedoch die Histaminwirkung um 50 % ($p < 0.005$).

3.2.3. Histamin und Adrenalin (Abb. 10 und 11)

Die cAMP-Bildungsrate über die Zeit wurde durch 10^{-3} mol/l Histamin im Mittel von 7.1 (basal) auf 14 pmol/mg Protein/min und damit auf das Doppelte signifikant gesteigert ($p < 0.005$). Adrenalin in der gleichen Konzen-

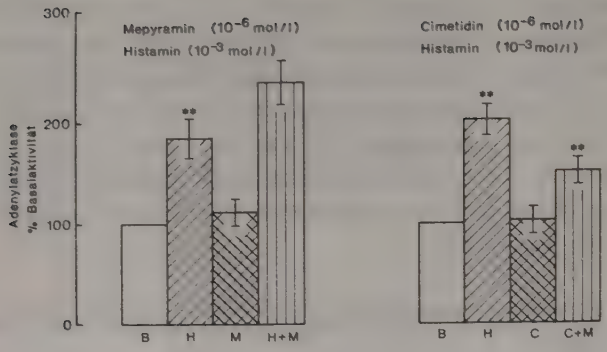

Abb. 9 Linke Seite: Einfluß des H_1-Rezeptorenblockers Mepyramin (M, 10^{-6} mol/l) auf die basale (B) und mit Histamin (H, 10^{-3} mol/l) stimulierte Adenylatzyklase menschlicher Fundusschleimhaut in Prozent der Basalaktivität (100 %).

Rechte Seite: Einfluß des H_2-Rezeptorenblockers Cimetidin (C, 10^{-6} mol/l) auf die basale (B) und mit Histamin (H, 10^{-3} mol/l) stimulierte Adenylatzyklase menschlicher Fundusschleimhaut.

N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, ++ = $p < 0.005$, links im Vergleich zum Basalwert, rechts im Vergleich zum Basalwert und zur histaminstimulierten Aktivität.

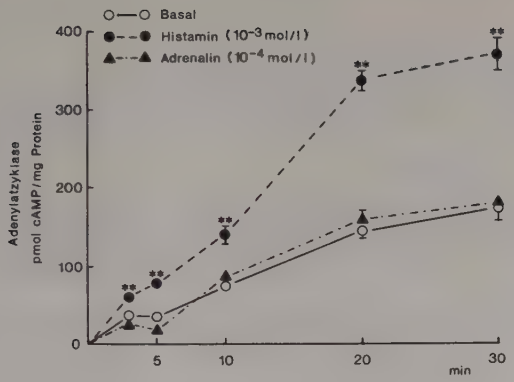

Abb. 10 Zeitverlauf der Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut unter Basalbedingungen und unter Histamin- (10^{-3} mol/l) oder Adrenalinstimulation (10^{-4} mol/l).
N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, ++ = $p < 0.005$ im Vergleich zum entsprechenden Basalwert.

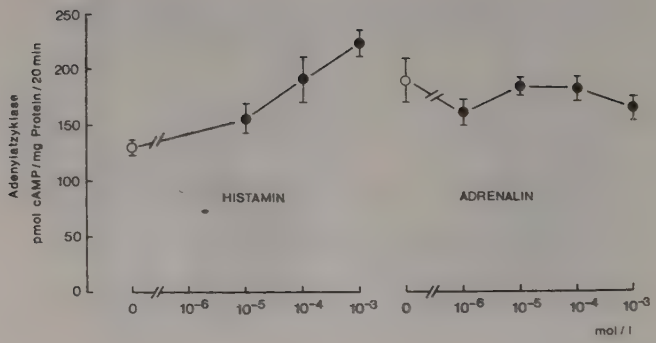

Abb. 11 Einfluß ansteigender Konzentrationen von Histamin und Adrenalin auf die Adenylatzyklaseaktivität menschlicher Fundusschleimhaut.
N = 6 - 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

tration hatte dagegen in dieser Funduspräparation keinen Effekt (Abb. 10). Histamin (10^{-5} - 10^{-3} mol/l) führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der cAMP-Bildungsrate. Der Maximaleffekt wurde mit 10^{-3} mol/l erreicht, entsprechend einer Steigerung der AC-Aktivität auf das 1.8-fache.
Adrenalin hatte im gleichen Konzentrationsbereich (10^{-6} - 10^{-3} mol/l) keinen stimulierenden Einfluß auf die Enzymaktivität (Abb. 11).

3.3. Einfluß von Histamin, Adrenalin, Pentagastrin, Carbachol und NaF auf die AC-Aktivität in Fundusbiopsieproben (Abb. 12)

Die Homogenate von 12 Biopsieproben von Patienten mit makroskopisch gesunder Fundusschleimhaut wurden auf ihre AC-Aktivität untersucht. Die mittlere Basalaktivität betrug 193 pmol cAMP/mg Protein/20 min. 10^{-5} mol/l Histamin steigerte den Basalwert um das 1.6-fache auf 505 pmol ($p < 0.05$), 10^{-5} mol/l Adrenalin sogar um das 2-fache ($p < 0.05$) auf 619 pmol/mg Protein/20 min. Auch unter Pentagastrin nahm die cAMP-Bildungsrate, wenn auch nicht signifikant, um 40 % zu. Das Parasympathomimetikum Carbachol (10^{-5} mol/l) hatte denselben Effekt. NaF (10^{-2} mol/l) steigerte die AC-Aktivität in diesen 12 Proben auf 1700 pmol cAMP/mg Protein/20 min, somit auf das 9-fache des Basalwertes.

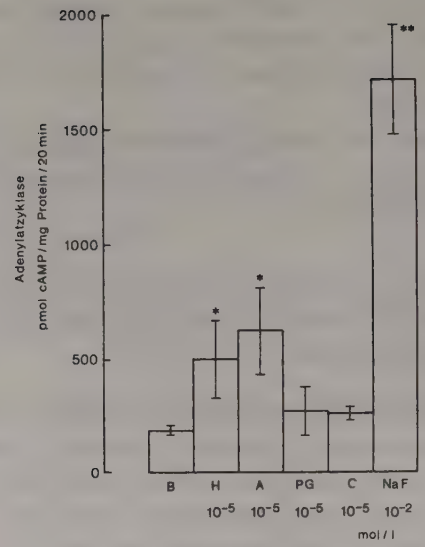

Abb. 12 Einfluß von Histamin (H, 10^{-5} mol/l), Adrenalin (A, 10^{-5} mol/l), Pentagastrin (PG, 10^{-5} mol/l), Carbachol (C, 10^{-5} mol/l) und NaF (10^{-2} mol/l) auf die Adenylatzyklaseaktivität in normalen Fundusbiopsieproben von 12 Personen.
N = 12, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.005$

4. DISKUSSION

4.1. Adenylatzyklasebestimmung

Die vorliegende Arbeit hat in ihrem ersten, methodischen Teil gezeigt, daß entsprechend den Befunden, die an Amphibien, Nagern und Säugetieren erhoben wurden, auch in der menschlichen Fundusschleimhaut des Magens eine AC-Aktivität nachweisbar ist. Bei den Experimenten mit menschlicher Schleimhaut wurden die optimalen Bedingungen und Substratkonzentrationen für den Enzymtest untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß es mit Hilfe des Gilman'schen Proteinbindungstests durchaus möglich ist, die Aktivität des Enzyms in minimalen Gewebeproben von 50 µg Feuchtgewicht aufwärts zu bestimmen. Von daher ist es nun auch technisch möglich, zahlreiche Messungen in einer einzigen Biopsieprobe dieses Organs durchzuführen und so, wie im zweiten Teil dieser Arbeit schon begonnen, Daten über die physiologische Rolle und pharmakologische Beeinflußbarkeit des AC-cAMP-Systems in Erfahrung zu bringen.

Eine Grundvoraussetzung für die Messung der AC ist eine zeitlineare Reaktion, gekennzeichnet durch eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit und einen konstanten Substratumsatz pro Zeiteinheit. Die Untersuchung über den Zeitverlauf der AC-Aktivität zeigte eine solche Linearität, sowohl unter Basalbedingungen als auch unter 14-facher Stimulation mit 10^{-2} mol/l NaF.
Der Mechanismus dieses stimulierenden Fluorideffektes, der bisher in allen Säugetiergeweben nachgewiesen wurde (Robison et al., 1968), ist noch nicht genau bekannt.

Man nimmt aber an, daß das Ion zu einer Zunahme der V_{max} führt, möglicherweise an der Stelle, wo die cAMP-Synthese durch die AC katalysiert wird (Birnbaumer et al.; Drummond et al., 1971).

Eine zweite Voraussetzung für die AC-Bestimmung in menschlichem Biopsiematerial bestand darin, daß auch bei Einsatz geringster Gewebemengen in der Größenordnung von 50 bis 200 µg, und damit entsprechend geringer Enzymproteinkonzentrationen, eine ausreichende Meßbarkeit der Enzymaktivität erzielt werden mußte. Es zeigte sich bei den Untersuchungen, daß in diesem Bereich tatsächlich eine lineare Beziehung zwischen der jeweiligen Proteinmenge und der gebildeten cAMP-Menge besteht und daß mit Hilfe der Gilman'schen Bestimmungsmethode der Einsatz von 34 µg Protein zu einem gut messbaren cAMP-Wert im mittleren Bereich der Eichkurve (0.5 - 5 pmol) führt. Unter diesen Voraussetzungen konnte an eine Untersuchung der AC auch in sehr kleinen Biopsieproben gedacht werden, wenn auch noch eine weitere Optimierung des Systems nötig war.

EDTA, ein Kalziumkomplexbildner, erhöhte bei niederen Konzentrationen die AC-Aktivität geringfügig, führte dagegen bei hoher Konzentration (10^{-2} mol/l) zu einer ausgeprägten Hemmung. Die Rolle des Ca^{++} in der Regulation der von zyklischen Nukleotiden abhängigen Zellfunktionen ist sehr komplex und in der Magenmukosa noch nicht erforscht. Der starke Abfall der AC-Aktivität bei hoher EDTA-Konzentration ist entweder auf eine Hemmung des Enzyms durch eine zu geringe Ca^{++}-Konzentration zurückzuführen, oder stellt bereits einen toxischen Effekt der Substanz auf das System dar, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entschieden werden kann. Nimmt man aber an,

daß der AC beim HCl-Sekretionsprozeß eine Schlüsselstellung zukommt, so spricht einiges dafür, daß Ca-Ionen für die Aktivität dieses Enzyms benötigt werden, denn die Entfernung der Ionen aus der Extrazellulärflüssigkeit mittels Chelatoren führt beim Menschen und bei einigen Tieren zu einer Hemmung der Säuresekretion (Hotz et al., 1971; Herting und Steenbock, 1955; Ward et al., 1964).

Die Tatsache, daß unter Dithiothreitol (DTT) die basale Enzymaktivität zunahm, entspricht den allgemeinen Erfahrungen mit dieser SH-Gruppen stabilisierenden Substanz. Die AC wird durch DTT gegen die Wirkung von Schwermetallspuren und Oxydation geschützt. EDTA in niederen Konzentrationen scheint dagegen über einen anderen Mechanismus zu wirken, denn der Effekt beider Substanzen zusammen auf die AC-Aktivität war additiv.

Wichtig für eine optimale Enzymaktivität ist Substratsättigung des Enzyms. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zu dem entstehenden Enzym-Substrat-Komplex und erreicht erst bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat ihr Maximum. Es zeigte sich, daß die AC aus der menschlichen Fundusschleimhaut bei 10^{-3} mol/l ATP Substratsättigung und damit die maximale Aktivität erreicht. Die Abnahme der Enzymaktivität bei höherer Substratkonzentration (10^{-2} mol/l) läßt sich als Substrathemmung (manche Enzyme reagieren bei hohen Substratkonzentrationen langsamer) erklären. Unter NaF war diese Hemmung besonders ausgeprägt. Der bekannte inhibitorische Effekt des NaF auf die ATPase könnte die Ursache dieses Phänomens sein.

Manche Enzyme benötigen Ionen als Aktivatoren. Die Peptidasen z.B. Zn^{++} und Co^{++}, die ATP-umsetzenden Enzyme

fast immer Mg^{++}. Der Einfluß dieser Ionen auf das Enzym ist aber in vielen Fällen ungeklärt. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigte eine sehr deutliche Abhängigkeit der AC-Aktivität von der Mg^{++}-Konzentration. In sehr hoher Konzentration (10^{-2} mol/l) hat $MgCl_2$ wahrscheinlich einen toxischen Effekt.

Theophyllin ist eine wichtige Komponente des Tests, denn es verhindert den Abbau von cAMP, des Reaktionsprodukts des untersuchten Enzyms, durch die im Gewebe enthaltenen Phosphodiesterasen. 1958 entdeckten Sutherland und Rall dieses ebenfalls Mg^{++}-abhängige Enzym in Leber-, Herz- und Hirnextrakten. Die PDE katalysiert den Abbau von cAMP zu 5′-AMP. Es ist das einzige bekannte physiologische Enzym, das die Aktivität des zyklischen Nukleotids beendet. Verschiedenartige PDE-asen kommen praktisch in allen tierischen Geweben vor. Die Vermutung, daß die Wirkung der Methylxanthine (Coffein, Theophyllin) auf die Säuresekretion der Magenschleimhaut über eine Hemmung der PDE mit nachfolgender Zunahme der cAMP-Konzentration abläuft, wird durch eine Untersuchung von Harris et al. (1969) unterstützt: Bei Amphibien erhöhten Methylxanthine die cAMP-Konzentration in der isolierten Mukosa vor Beginn der Säuresekretion. Der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene Theophyllineffekt auf das im Ansatz vorgefundene cAMP zeigt, daß auch in der menschlichen Magenmukosa eine PDE anwesend ist. Bei der Untersuchung der AC-Aktivität im rohen Homogenat und bei Anwendung der Gilman-Technik ist somit unbedingt ein PDE-Hemmer im Inkubationsmedium notwendig.

4.2. Aktivierung und Hemmung der AC durch verschiedene Substanzen

Ab einer Konzentration von 10^{-5} mol/l wurde die Basalaktivität des Enzyms durch die beiden Histaminantagonisten Mepyramin und Cimetidin signifikant gehemmt. Dies ließ zunächst vermuten, daß durch den Homogenisationsprozeß endogenes Histamin freigesetzt wurde, dessen stimulierender Effekt durch die Histaminantagonisten ab einer bestimmten Konzentration gehemmt wurde. Diese Vermutung geht auf eine Beobachtung von Ruoff und Sewing (1976) zurück, die in der Magenschleimhaut des Hundes eine endogene Histaminstimulation der AC nachweisen konnten. Da die menschliche Magenschleimhaut jedoch wesentlich weniger Histamin als die des Hundes enthält, muß diese Interpretation sehr in Frage gestellt und ein unspezifischer Effekt als wahrscheinlicher angenommen werden, umsomehr, als die weiteren Versuche eindeutig gezeigt haben, daß 10^{-6} mol/l Cimetidin ein effektiver Blocker der Histaminwirkung war, wohingegen der H_1-Antagonist Mepyramin in derselben Konzentration keine Wirkung auf den Histamineffekt zeigte.

Der Einfluß von Histamin auf die AC-Aktivität wurde über die Zeit und in Abhängigkeit von der Histaminkonzentration untersucht. Während der gesamten Inkubationsdauer wurde die cAMP-Bildung um das Doppelte gesteigert. Dies spricht dafür, daß die Histaminkonzentration während des Versuchs nicht abnimmt und daß die Bindung des Sekretagogs an seinen Rezeptor und die Aktivierung der AC über die Zeit konstant abläuft. Da Histamin darüberhinaus auch konzentrationsabhängig die Enzymaktivität steigerte, besteht an einem stimulierenden Histamineffekt auf die AC der menschlichen Fundusmukosa kein Zweifel

mehr. In diesem Zusammenhang erfährt die cAMP-Hypothese der HCl-Sekretion durch diese Untersuchungen insofern weitere Unterstützung, als der selektive H_2-Rezeptorenblocker Cimetidin die Histaminwirkung auf die AC hemmte, während der H_1-Antagonist Mepyramin keine Hemmung aufwies. Damit wird klar, daß in der menschlichen Magenschleimhaut die Wirkung des Histamins auf AC-Aktivität und Säuresekretion ein über Histamin-H_2-Rezeptoren vermittelter Prozeß ist.

Histaminstimulierbarkeit der AC wurde ebenfalls bei Amphibien (Nakajiama et al., 1971; Ray und Forte, 1974) und auch bei Nagetieren, vor allem dem Meerschweinchen (Dousa und Code, 1974), nachgewiesen. Kontroverse Daten wurden jedoch zu der Frage veröffentlicht, ob die Aktivierung der AC ausschließlich über H_2-Rezeptoren vermittelt wird. Karppanen et al. (1974) zeigten, daß im nicht homogenisierten Gewebe, d.h. in intakten Schleimhautpartikeln des Meerschweinchenfundus, der H_2-Rezeptor-Antagonist Burimamid in der Lage war, die intrazelluläre cAMP-Produktion zu hemmen, während der H_1-Rezeptorantagonist Diphenhydramin keine Wirkung zeigte. Antilla et al. (1976) berichteten jedoch, daß die zellfreie AC der Magenschleimhaut dieser Spezies im gleichen Ausmaß durch H_1- und H_2-Rezeptor-Antagonisten gehemmt wird. Diese Ergebnisse wurden durch Thompson und Jacobson (1977) und durch Perrier und Griessen (1976) bestätigt. Die letzteren Autoren demonstrierten sogar für beide Antagonisten einen kompetitiven Hemmechanismus. In einer methodischen Untersuchung von Ruoff (1978), ebenfalls in der Meerschweinchenmagenschleimhaut, konnte dann gezeigt werden, daß es während der Enzympräparation durch mechanische Einflüsse zu einem Verlust der H_2-Rezeptor-Spezifität kommen kann, so daß das Enzym gleich empfindlich gegen

H_1- und H_2-Rezeptor-Antagonisten wird. Was die menschliche Schleimhaut betrifft, so sind dort wesentlich weniger Daten ermittelt worden; jedoch haben Simon und Kather (1977 und 1978) kürzlich gezeigt, daß der Histamineffekt auf die AC aus menschlicher Fundusschleimhaut durch Cimetidin kompetitiv gehemmt werden kann. Allerdings wurde die Wirkung eines H_1-Rezeptor-Antagonisten nicht geprüft. Ferner konnten dieselben Autoren zeigen, daß der selektive H_2-Rezeptor-Agonist 4-Methyl-Histamin ebenso wirksam war wie Histamin, während 2-Pyridyl-Äthylamin, ein selektiver H_1-Rezeptor-Agonist kaum eine aktivierende Wirkung auf die AC dieser Präparation aufwies. Diese Ergebnisse, die an Resektionspräparaten ermittelt wurden, sind in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten.

Somit ist die Aktivierung der AC aus menschlicher Fundusschleimhaut durch Histamin ebenso wie die stimulierende Wirkung dieses biogenen Amins auf die Säuresekretion ein über H_2-Rezeptoren vermittelter Prozeß. Dieser Befund und die Tatsache, daß Histamin nur die AC der Fundusschleimhaut, d.h. des sekretorischen Anteils des Magens, aktiviert und daß das Enzym an der Antrum- und oberen Duodenalschleimhaut unempfindlich gegen Histamin ist (Ruoff et al., 1977), sind eindeutige Ergebnisse, die für eine Mediatorrolle des cAMP bei der histaminstimulierten Säuresekretion sprechen.

Durch Adrenalin war in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Adrenalinkonzentration keine signifikante Änderung der cAMP-Bildung in den Homogenaten des Resektionspräparates feststellbar. In den Fundusbiopsieproben steigerte Adrenalin jedoch die AC-Aktivität um das 2-fache. Diese Diskrepanz könnte in methodischen

Unterschieden der Gewebegewinnung eine Erklärung finden: Das Funduspräparat konnte nicht so schnell tiefgefroren werden wie die Biopsieproben; außerdem wurde das Resektionsmaterial in Narkose entnommen. Da aber auch bei 2 der 12 untersuchten Biopsieproben Adrenalin keinen Effekt gezeigt hatte, muß auch an eine unterschiedliche individuelle Ansprechbarkeit der AC auf Adrenalin gedacht werden.

Obwohl Adrenalin das klassische Stimulans der AC ist, gibt es bisher kaum Untersuchungen, die die AC der Magenschleimhaut auf ihre Adrenalinempfindlichkeit geprüft hätten. 1967 hatten Robison et al. eine generelle Beziehung zwischen adrenerger ß-Rezeptorenstimulation und Aktivierung der AC postuliert, was sich seither in vielen Geweben bestätigen ließ. Auch die Magenmukosa, obwohl sie kein typisches Zielorgan für Katecholamine ist, scheint in dieser Hinsicht keine Ausnahme zu machen. In der Magenschleimhaut der Ratte führte i.p. injiziertes Adrenalin über eine ß-Rezeptorenstimulation zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg (Ruoff, 1977).
In der menschlichen Magenschleimhaut sind Ergebnisse über dieses Stimulans recht spärlich. Ruoff et al. (1977) zeigten, daß Adrenalin nicht nur die AC aus der Fundusschleimhaut, sondern auch die des Antrums aktiviert. Simon und Kather (1977) beobachteten eine in gleichem Maße gegen Adrenalin und das ß-Sympathomimetikum Isoproterenol empfindliche AC der menschlichen Fundusschleimhaut, die durch den ß-Rezeptorenblocker Propranolol hemmbar war. Dies bestätigt die Ansicht, daß auch die AC aus menschlicher Magenschleimhaut über adrenerge ß-Rezeptoren aktiviert wird. Da aber diese Aktivierbarkeit der AC durch Adrenalin noch keinem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden konnte und eine Korrelation zu einem physiologischen

Prozeß in der Magenschleimhaut auch nicht möglich ist, kann über die Bedeutung dieser Vorgänge bis jetzt nur spekuliert werden. Eine mögliche Wirkung der Katecholamine über den cAMP-Mechanismus wäre bei der Glykolyse und Lipolyse der Magenschleimhaut (Forte und Solberg, 1973) oder bei der Regulation der Mikrozirkulation und der Pepsinogensekretion (Holten, 1973) denkbar.

In Biopsiematerial aus der makroskopisch gesunden Fundusschleimhaut von 12 Personen ließ sich die AC durch Histamin, Adrenalin und NaF signifikant stimulieren. Pentagastrin und das Parasympathomimetikum Carbachol (Doryl^{R}) waren weniger wirksam. Der Unterschied gegenüber der Basalaktivität ließ sich statistisch nicht sichern. Es erscheint deshalb fraglich, ob auch die sekretionsstimulierende Wirkung von Gastrin bzw. Pentagastrin und Carbachol über das cAMP-System vermittelt wird. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung müssen diese Frage noch klären.

Bei Amphibien ließ sich die AC der Magenschleimhaut durch Pentagastrin in vivo und in vitro aktivieren und der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöhen (Nakajiama et al., 1971; Ray und Forte, 1974; Charters et al., 1973). Bei Nagern zeigte sich bislang nur nach in vivo Applikation von Gastrin ein Effekt auf die AC (Bersimbaev et al., 1971; Perrier und Laster, 1969; Holian et al., 1975). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß in der Rattenmagenschleimhaut Gastrinrezeptoren (Soumarmon et al., 1977) und eine gastrinempfindliche AC vorkommen (Bali et al., 1977; Náfrády und Wollemann, 1977). Da Cimetidin keine Hemmwirkung aufwies, muß eine Aktivierung über unterschiedliche Rezeptoren angenommen werden. Demgegenüber steht allerdings der Befund von Domschke et al.

(1974), die in menschlichen Magenschleimhautbiopsien nach Pentagastrininfusion keinen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel feststellen konnten und auch bei 2 Patienten mit extrem hohen Serumgastrinspiegeln keine über die Norm erhöhten Werte fanden.

Über die Bedeutung cholinerger Stimulation der HCl-Sekretion in Zusammenhang mit dem AC-cAMP-System liegen bis jetzt recht widersprüchliche und bezüglich einer Aktivierbarkeit der AC in der Säugetiermagenschleimhaut praktisch keine positiven Ergebnisse vor. Hier wie auch beim Menschen muß deshalb eine cAMP-Beteiligung bei der Säurestimulation durch vagale Reize bezweifelt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen an anderen Körpergeweben überein, in welchen auch keine Beziehung des Acetylcholins zum cAMP-System nachgewiesen werden konnte.

Wenn auch schon wie im Fall des Histamins eindeutige Ergebnisse vorliegen, so sind jedoch noch weitere Daten nötig, um die Rolle des AC-cAMP-Systems beim Säuresekretionsprozeß klar zu definieren. Eine Möglichkeit dazu ergibt sich mit der hier vorgestellten Methode der AC-Messung in Biopsiematerial. Von daher können unabhängig von Versuchstieren Untersuchungen direkt am Menschen durchgeführt und klinische Aspekte berücksichtigt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Basierend auf dem Gilman'schen cAMP-Proteinbindungstest wurden Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität in menschlicher Magenschleimhaut durchgeführt und optimale Konzentrationen des Homogenisations- und Inkubationsmediums für eine maximale cAMP-Bildungsrate ermittelt.
Der Test erlaubt Bestimmungen der Enzymaktivität in Gewebemengen von 50 µg Feuchtgewicht oder 10 µg Protein. Damit können auch mehrere Messungen in einer Biopsieprobe der menschlichen Magenschleimhaut vorgenommen werden.

Mit Hilfe dieses Tests wurde die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Adenylatzyklaseaktivität untersucht. Im rohen Schleimhauthomogenat eines Magenresektionspräparates ergaben sich folgende Befunde:
NaF stimuliert die basale Aktivität um das 7 - 11-fache. Histamin aktiviert die Adenylatzyklase zeitkonstant und konzentrationsabhängig um das 1 - 2-fache. Dieser Effekt wird durch den Histamin-H_1-Rezeptorenblocker Mepyramin nicht beeinflußt, durch den H_2-Antagonisten Cimetidin jedoch gehemmt.

In 12 Biopsieproben aus normaler menschlicher Fundusschleimhaut fand sich eine Basalaktivität von 193 pmol cAMP/mg Protein/20 min, die durch 10^{-2} mol/l NaF um 800 %, durch 10^{-5} mol/l Histamin um 150 % und durch 10^{-5} mol/l Adrenalin um 200 % signifikant gesteigert wurde. 10^{-5} mol/l Pentagastrin und Carbachol bewirkten nur eine 40 %ige nicht signifikante Steigerung.

Die Wirkung des Histamin auf Adenylatzyklase und Säuresekretion ist ein Histamin-H_2-Rezeptoren-spezifischer Prozeß. Das AC-cAMP-System kommt als ein möglicher Koppelungsmechanismus der Histamin-stimulierten Säuresekretion in Frage.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alonso, D. and Harris, J.B.: Effect of xanthines and histamine on ion transport and respiration by frog gastric mucosa. Am.J.Physiol. 208, 18 - 23 (1965)

Antilla, P., Lücke, C. and Westermann, E.: Stimulation of adenylate cyclase of guinea pig gastric mucosa by histamine, sodium fluoride and 5'-guanylylimidodiphosphate and inhibition by histamine H_1- and H_2-receptor antagonists in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 269, 31 - 36 (1976)

Bali, J.P., Soumarmon, A., Lewin, M. and Bonfils, S.: A gastrin sensitive adenylate cyclase system in rat gastric mucosa. In: Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, p. 401. Ed. S. Bonfils, P. Fromageot and G. Rosselin, Elsevier North-Holland Biochemical Press 1977

Bersimbaev, R.I., Argutinskaya, S.V. and Salganik, R.I.: The stimulating action of gastrin pentapeptide and histamine on adenyl cyclase activity in rat stomach. Experientia 27, 1389 - 1390 (1971)

Birnbaumer, L., Pohl, S.L. and Rodbell, M.: The glucagon sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver.II. Comparison between glucagon and fluoride stimulated activities. J.Biol.Chem. 246, 4166 - 4173 (1971)

Charters, A.C., Chandler, J.G., Rosen, H. and Orloff, M.J.: The role of cyclic AMP in gastric acid secretion (abstr.). Gastroenterology 64, 708 (1973)

Dousa, T.P. and Code, C.F.: Effect of histamine and its methyl derivates on cyclic AMP metabolism in gastric mucosa and its blockade by an H_2-receptor antagonist. J.Clin.Invest. 53, 334 - 337 (1974)

Drummond, G.I., Severson D.L. and Duncan, L.: Adenyl cyclase. Kinetic properties and nature of fluoride and hormone stimulation. J.biol.Chem. 246, 4166 - 4173 (1971)

Forte, J.G. and Solberg, L.A.jr.: Pharmacology of isolated amphibian gastric mucosa. In: Pharmacology of Gastrointestinal Motility and Secretion, Vol. I, 195 - 260. Editor: P. Holton, N.Y.: Pergamon Press 1973

Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate. Proc.Nat.Acad.Sci. 67, 305 - 312 (1970)

Harris, J.B., Nigon, K. and Alonso, D.: Adenosine 3′,5′-monophosphate: Intracellular mediator for methyl xanthine stimulation of gastric secretion. Gastroenterology 57, 377 - 384 (1969)

Herting, D.C. and Steenbock, H.: Vitamin D and gastric secretion. J.Nutr. 57, 469 - 482 (1955)

Holian, O., Gabrys, B.F., Nyhus, L.M. and Bombeck, C.T.: Is there cAMP in gastric secretion (abstr.). Advances in Cyclic Nucleotide Research 5, 820 (1975)

Holton, P.: Catecholamines and gastric secretion. In: Pharmacology of Gastrointestinal Motility and Secretion, Vol. 1, 287 - 315. Editor: P. Holton, N.Y.: Pergamon Press 1973

Hotz, J., Minner, H. und Ziegler, R.: Das Verhalten der Magensekretion des Menschen bei akuter ÄDTA-Hypocalcämie. Verh.dt.Ges.inn.Med. 77, 501 - 504 (1971 a)

Hotz, J., Widmaier, F., Minner, H. and Ziegler, R.: Serum calcium und gastric secretion in chronic gastric fistula rat: Influence of parathyroid hormone and calcitonin. Europ.J.clin.Invest. 1, 486 - 490 (1971 b)

Jacobson, E.D. and Thompson, W.J.: Cyclic AMP and gastric secretion: The illusive second messenger. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 7, 1976

Kimberg, D.V.: Cyclic nucleotides and their role in gastrointestinal secretion. Gastroenterology 67, 1023 - 1064 (1974)

Karppanen, H.O., Neuvonen, P.J., Bieck, P.R. and Westermann, E.: Effect of histamine, pentagastrin and theophylline on production of cyclic AMP in isolated gastric tissue of the guinea pig. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, 15 - 23 (1974)

Miyamoto, E., Kuo, J.F. and Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. III. Purification and properties of adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. J.Biol.Chem. 244, 6395 - 6402 (1969)

Náfrády, J. and Wollemann, M.: Direct stimulatory action of pentagastrin on the adenylate cyclase of rat stomach mucosa. Biochem.Pharmacol. 26, 2083 - 2085 (1977)

Nakajiama, S., Hirschowitz, B.I. and Sachs, G.: Studies on adenylcyclase in Necturus gastric mucosa. Arch.Biochem.Biophys. 143, 123 - 136 (1971)

Orloff, J. and Handler, J.S.: The similarity of effects of vasopressin, adenosine 3′,5′-phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder. J.Clin.Invest. 41, 702 - 709 (1962)

Perrier, C.V., Griessen, M.: Action of H_1 and H_2 inhibitors on the response of histamine sensitive adenyl cyclase from guinea pig mucosa. Europ.J.clin.Invest. 6, 113 - 120 (1976)

Perrier, C.V. and Laster, L.: Adenyl cyclase activity of guinea pig gastric mucosa (abstr.). Clin.Res. 17, 596 (1969)

Rall, T.W. and Sutherland, E.W.: Formation of cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J.Biol.Chem. 232, 1065 - 1076 (1958)

Rall, T.W., Sutherland, E.W. and Berthet, J.: The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. J.Biol. Chem. 224, 463 - 475 (1957)

Ray, T.K. and Forte, J.G.: Adenyl cyclase of oxyntic cells. Its association with different cellular membra-

nes. Biochem.Biophys. Acta 320 - 339 (1974)

Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W.: Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann. N.Y. Acad.Sci. 139, 703 - 723 (1967)

Rodbell, M., Birnbaumer, L. and Pohl, S.L.: Hormones, receptors and adenyl cyclase activity in mammalian cells. In: The Role of Adenyl cyclase and Cyclic 3′,5′-AMP in Biological Systems, pp. 50 - 103. Eds. T.W. Rall, M. Rodbell and P. Condliffe. Washington: U.S. Printing Office 1971

Ruoff, H.-J.: Rat gastric mucosal cAMP and cGMP after adrenergic stimulation and blockade. Europ.J.Pharmacol. 44, 349 - 354 (1977)

Ruoff, H.-J.: Adenylate cyclase and specificity of the histamine H_2-receptor in the gastric mucosa of the guinea pig. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 302, R 26 (1978)

Ruoff, H.-J. and Sewing, K.-Fr.: Adenylate cyclase and phosphodiesterase in the rat gastric mucosa after starvation, feeding and pentagastrin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 288, 147 - 153 (1975)

Ruoff, H.-J. and Sewing, K.-Fr.: Adenylate cyclase of the dog gastric mucosa: Stimulation by histamine and inhibition by metiamide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294, 207 - 208 (1976)

Ruoff, H.-J. and Sewing, K.-Fr.: Cyclic nucleotides and gastric secretion. In: Cyclic 3′,5′-Nucleotides:

Mechanisms of Action, pp. 147 - 159. Eds. H. Cramer and J. Schultz. London: John Wiley and Sons Ltd 1977

Ruoff, H.-J., Malchow, H. and Sewing, K.-Fr.: Adenylate cyclase in human biopsies from oxyntic and pyloric gland area and duodenal mucosa. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, R 26 (1977)

Simon, B. and Kather, H.: Histamine-sensitive aderylate cyclase of human gastric mucosa. Gastroenterology 73, 429 - 431 (1977)

Simon, B., Kather, H. and Kommerell, B.: Histamine-sensitive adenylate cyclase of human gastric mucosa: A model for H_2-receptor excitation. Brit.J.Clin.Pharmacol. 5, 277 - 278 (1978)

Soderling, T.R., Hickenbottom, J.P., Reimann, E.M., Hunkeler, F.L., Walsh, D.A. and Krebs, E.G.: Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by muscle adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein kinase. J.Biol.Chem. 245, 6317 - 6328 (1970)

Soll, A.H.: Effects of the H_2-antagonists on histamine action and interaction with gastrin in isolated parietal cells (abstr.). Gastroenterology 74, 355 (1978)

Sonnenberg, A., Hunziker, W., Koelz, H.R., Fischer, J.A. and Blum, A.L.: Stimulation of endogenous cyclic AMP (cAMP) in isolated gastric cells by histamine and prostaglandin. Acta physiol.scand.Special Suppl., 307 - 317 (1978)

Soumarmon, A., Cheret, A.M. and Lewin, M.J.M.: Localization of gastrin receptors in intact isolated and separated rat fundic cells. Gastroenterology 73, 900 - 903 (1977)

Steiner, A.L., Parker, C.W. and Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. J.Biol. Chem. 247, 1106 - 1113 (1972 a)

Steiner, A.L., Pagliara, A.W., Chase, L.R. and Kipnis, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3′,5′-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. J.Biol.Chem. 247, 1114 - 1120 (1972 b)

Sutherland, E.W. and Rall, T.W.: Fractionization and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J.Biol.Chem. 232, 1077 - 1091 (1958)

Thompson, W.J. and Jacobson, E.D.: Comparison of the effects of secretory stimulants and inhibitors on gastric mucosal adenyl cyclases of various species. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 154, 377 - 381 (1977)

Ward, J.T., Adesola, A.O. and Welbourn, R.B.: The parathyroids, calcium and gastric secretion in man and the dog. Gut 5, 173 - 183 (1964)

LEBENSLAUF

Am 16. 9. 1953 wurde ich, Maria Rack, als Tochter des Stadtamtmanns Ernst Rack und seiner Ehefrau Maria, geb. Ege, in Wangen im Allgäu als 2. von 6 Kindern geboren. Ich bin röm.-kath. und deutsche Staatsangehörige.
Nach Abschluß der Schulzeit in Wangen mit dem neusprachlichen Abitur im Sommer 1972 begann ich im Wintersemester 72/73 mit dem Medizinstudium an der Universität Freiburg. Ich machte im Frühjahr 1975 die ärztliche Vorprüfung und wechselte anschließend zum klinischen Studium nach Tübingen. Dort begann ich im Sommer 1976 im Pharmakologischen Institut bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Ruoff mit meiner Dissertationsarbeit. Den letzten Teil des Medizinstudiums, das Praktische Jahr, machte ich von Oktober '78 bis Oktober '79 – mit Frauenheilkunde als Wahlfach – an den Städtischen Krankenanstalten in Esslingen. Abschluß des Studiums mit der 3. ärztlichen Prüfung am 22.10.1979.